

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**(54) MONOCLONAL ANTIBODY CAPABLE OF RECOGNIZING hBNP AND METHOD FOR MEASURING IMMUNITY OF hBNP USING THE SAME ANTIBODY**

(11) 3-297392 (A) (43) 27.12.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 2-99623 (22) 16.4.1990  
 (71) SHIONOGI & CO LTD (72) HIROO IMURA(1)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P21/08, C12N5/18, C12N15/06, G01N33/53, G01N33/577//C12P21/08, C12R1/91

**NEW MATERIAL:** A monoclonal antibody capable of recognizing hBNP.

**USE:** Useful in study of biosynthesis, intracellular modification and metabolism of hBNP (human brain sodium diuretic peptide) and capable of carrying out diagnosis of disease using increase and decrease of hBNP as an index.

**PREPARATION:** A spleen cell of mouse immunized with a peptide having hBNP immune activity is fused with a myeloma cell to give a hybridoma and a hybridoma [e.g. Mouse Hybridoma KY-hBNP-I (FERM HP-2862)] capable of producing the above-mentioned monoclonal antibody is selected from the resultant hybridoma and the monoclonal antibody is produced from the above-mentioned hybridoma.

**(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 1,3-BUTANE DIOL**

(11) 3-297394 (A) (43) 27.12.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 2-104115 (22) 18.4.1990  
 (71) DAICEL CHEM IND LTD (72) KUNIO FUKUNISHI(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P41/00

**PURPOSE:** To obtain the title diol capable of carrying out high-concentration charge of substrate and having high productivity in the production on an industrial scale by treating an enantiomer mixture of 1,3-butane diol with a microorganism while controlling concentration of a treating liquid of enantiomer reverse to the aimed enantiomer.

**CONSTITUTION:** When an enantiomer mixture of 1,3-butane diol is treated with a microorganism to collect residual diol, an enantiomer mixture of 1,3-butanediol is added to the treating system and treated with a microorganism while controlling concentration in treating liquid of an enantiomer reverse to an enantiomer to be produced to provide the aimed diol. Furthermore, concentration in the treating liquid of the enantiomer reverse to the enantiomer to be produced is preferably controlled to the range of 0.5 to 1.5wt.%.

**(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE DIOL**

(11) 3-297395 (A) (43) 27.12.1991 (19) JP  
 (21) Appl. No. 2-104116 (22) 18.4.1990  
 (71) DAICEL CHEM IND LTD (72) KUNIO FUKUNISHI(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P41/00//C07C31/20

**PURPOSE:** To obtain the title diol while preventing lowering of optical purity in the production on industrial scale by treating an enantiomer mixture of a diol with a microorganism and subjecting the treatment-finished liquid to treatment for preventing lowering of optical purity.

**CONSTITUTION:** When an enantiomer mixture of a diol (preferably 1, 3-butanediol) is treated with a microorganism to collect the residual optically active diol, the treatment-finished liquid is subjected to treatment for preventing lowering of optical purity to provide the aimed diol while preventing lowering of optical purity of the remaining optically active diol. Furthermore, in the above-mentioned preventing treatment, the liquid after treatment with the microorganism was finished is put at least under aerobic conditions and the liquid is preferably subjected to heating treatment, cooling treatment, acidification treatment or base-forming treatment or treatment in which an organic solvent is added.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-297392

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成3年(1991)12月27日  
C 12 P 21/08 8214-4B  
C 12 N 5/18  
15/06  
G 01 N 33/53 D 7906-2J  
33/577 B 9015-2J  
// (C 12 P 21/08  
C 12 R 1:91)  
8717-4B C 12 N 15/00 C  
7236-4B 5/00 B  
審査請求 未請求 請求項の数 11 (全12頁)

⑯ 発明の名称 hBNPを認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いるhBNPの免疫測定法

⑰ 特 願 平2-99623

⑱ 出 願 平2(1990)4月16日

⑲ 発 明 者 井 村 裕 夫 京都府京都市左京区一乗寺北大丸町59-2  
⑳ 発 明 者 中 尾 一 和 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2  
㉑ 出 願 人 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号  
㉒ 代 理 人 弁理士 岩崎 光隆

明 細 書

1. 発明の名称

hBNPを認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いるhBNPの免疫測定法

2. 特許請求の範囲

- (1) hBNPを認識するモノクローナル抗体。
- (2) hBNPのリング構造を認識する請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- (3) hBNPに対して $10^{-11}$ M以上の親和定数を有する請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- (4) hBNPのC末端断片、rBNP、および $\alpha$ -hANPを実質的に認識しない請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- (5) IgG、サブクラスに属する請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- (6) モノクローナル抗体KY-hBNP-IまたはKY-hBNP-IIである請求項1に記載のモノクローナル抗体。
- (7) 請求項1～6のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(8) ハイブリドーマKY-hBNP-IまたはKY-hBNP-IIである請求項7に記載のハイブリドーマ。

(9) 請求項7または8に記載のハイブリドーマをマウスの腹腔内で増殖させ、該腹腔内に蓄積された腹水から請求項1～6のいずれかに記載のモノクローナル抗体を採集することを特徴とする該モノクローナル抗体の製造方法。

(10) 請求項1～8のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いるhBNPの免疫測定法。

(11) ラジオイムノアッセイである請求項10に記載の免疫測定法。

2. 発明の詳細な説明

背景上の利用分野

本発明は、hBNPを認識するモノクローナル抗体および該抗体を用いるhBNPの免疫測定法に関する。

さらに詳細には、hBNPのリング構造を認識

し、 $10^{-11}\text{M}$ 以上の親和定数を有し、hBNPのC末端断片、rBNP、および $\alpha$ -hANPを實質的に認識せず、I & Gサブクラスに属するモノクローナル抗体および該抗体を用いるhBNPのラジオイムノアッセイに関する。

#### 従来の技術

心臓性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の心臓における発見、およびそれに続く脳における発見以来、ANPは、ホルモンおよび神経ペプチドとして、体液の恒常性および血圧調節に関連するものとされてきた(Hakao, K.ら, J. Hypertension 4[Suppl 8]:5492-5496, 1986)。本発明者らは既に、心臓におけるANPの合成および分泌が、鬱血性心臓疾患患者において、その重症度に応じて増加することを示した(Sugawara, A.ら, J. Clin. Invest. 81:1962-1970, 1988)。

最近、豚の脳から、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が単離された。これには、28個のアミノ酸残基からなる豚(p)BNP-28と、3

ら、FEBS Lett. 259:341-345, 1990)。hBNPは32アミノ酸残基からなり、hBNP前駆体の配列77-108に一致する。

#### 発明が解決しようとする課題

hBNPを特異的に認識するモノクローナル抗体は未だ得られておらず、また、上記の様にhBNPはpBNPやrBNPに対する抗血清に交差反応性を有しないため、hBNPに関する報告はほとんどなく、未解明の部分が多く残されている。

従って、hBNPを特異的に認識するモノクローナル抗体が得られれば、hBNPに関する研究の進歩に大いに貢献するものとなり、hBNPの医薬などとしての応用が期待される。また、hBNPの測定系が確立されれば、hBNPの増減を指標とする疾病の診断が可能になる。

#### 課題を解決するための手段

上記の状況に鑑みて、本発明者は、鋭意研究

2個のアミノ酸残基からなるpBNP-32が存在する。また、これらは、ANPと顕著なアミノ酸配列相同性を有しており、ANPと類似した末梢および中枢での作用を有している(Sudoh, I.ら, Nature 332:78-81, 1988)。本発明者らは、さらに、BNPは豚心臓でも合成され、血液へ分泌されることを示した(Seito, Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 158:360-368, 1989)。それに続き、ラット心臓から45アミノ酸残基からなるラットBNP(rBNP)が単離された(Itoh, H.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:732-739, 1989)。しかし、現在なお、ヒトBNPに関する報告は殆ど無く、これは主に、ヒトBNP(hBNP)がpBNPやrBNPに対する抗血清に交差反応性を有しないためである。

最近、hBNP前駆体をコードするcDNA配列の解明に続き(Sudoh, I.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 159:1427-1434, 1989)本発明者らは、ヒト心臓からhBNPを単離し、そのアミノ酸配列を決定した(Kambayashi, Y.

を行なった結果、hBNPに対するモノクローナル抗体を調製し、hBNPに特異的なラジオイムノアッセイ(RIA)を確立することに成功した。さらに、このRIAを用いることにより、健康ヒト心臓および病的ヒト心臓におけるhBNPの合成と分泌を詳細に検討することができた。

本発明は、hBNPを認識するモノクローナル抗体を提供する。該モノクローナル抗体は、以下のような性状を有しているのが好ましい。

(1)hBNPのリング構造を認識する

(2)hBNPに対して $10^{-11}\text{M}$ 以上の親和定数を有する

(3)hBNPのC末端断片、rBNP、および $\alpha$ -hANPを實質的に認識しない

(4)I & Gサブクラスに属する

詳細には、本発明においては、上記の性状を有するモノクローナル抗体KY-hBNP-IおよびKY-hBNP-IIが得られた。

本発明のモノクローナル抗体KY-hBNP-IまたはKY-hBNP-IIを産生するハイブリ

ドーマは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の微生物工業技術研究所に、平成2(1990)年4月11日から、Mouse Hybridoma KY-hBNP-IおよびMouse Hybridoma KY-hBNP-II、農工研発第2862号(FERM BP-2862)および農工研発第2863号(FERM BP-2863)として、それぞれブダベスト条約に基づき寄託されている。

本発明のハイブリドーマは、hBNP免疫活性を有するペプチドで免疫したマウスの脾臓細胞と、適切なマーカーを有するミエローマ細胞との融合により得られたハイブリドーマから、上記の様な性状を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。このハイブリドーマの調製は、実質的に、Mukoyama, H.ら、Hypertension 12:117-121, 1985に記載の方法に従えばよい。hBNP免疫活性を有するペプチドとしては、本来のhBNP(hBNP前駆体の77-108アミノ酸配列に対応)のみならず、例えばhBNP前駆体の88-108ア

ミノ酸配列に対応するhBNP-28を使用してもよい。

得られたハイブリドーマはマウスの腹腔内で増殖させ、該腹腔内に蓄積された腹水からモノクローナル抗体を採集する。ハイブリドーマを培養液中で培養し、該培養液からモノクローナル抗体を採集することも可能であるが、生産性の点で前者が好ましい。

本発明は、さらに、上記の性状を有するモノクローナル抗体を用いるhBNPの免疫測定法を提供する。この免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイが好ましい。本発明のRIAは、上記の優れた性状を有するモノクローナル抗体を使用するので、最小検出濃度が $0.8 \text{ fmol/tube}$ 、50%結合阻害濃度が $2.5 \sim 3 \text{ fmol/tube}$ と極めて高感度であり、かつ、 $\alpha$ -hBNPやrBNPと実質的に交差反応性を有せずhBNPに極めて特異的である。また、本発明のRIAは極めて高感度かつ特異的であるため、例えば血漿からhBNPを抽出することなく、血漿サ

ンプル中のBNPレベルを直接測定することが可能である。

さらに、このRIAを用いることにより、健康ヒト心臓および病的ヒト心臓におけるhBNPの合成と分泌を詳細に検討することができた。

本発明においては、BNPがヒトの新規な心臓ホルモンであることが示された。冠状静脈洞から採取された血漿中のhBNPの濃度の上昇(表Ⅱ)から、循環血液中のhBNP源が心臓であることは明らかである。組織hBNPレベルは、心房よりも心室のほうが高いが、BNP/ANP比は心房よりも心室のほうが遙かに高く、心臓の全hBNP量に対する心室hBNPの比率は、心室ANPのそれと比べて、一桁高い値を示す(表Ⅰ)。これらの知見から、心室がかなりの量のhBNPを産生分泌するので、心室は、循環血液中のhANPよりも、循環血液中のhBNPにより大きな影響を及ぼすと考えられる。以上の仮説は、心室の心臓細胞が、心房の心臓細胞よりも迅

速に、コンスティテューティブ(constitutive)経路を介して分泌するという報告にも支持される。

本発明においては、血漿hBNPレベルが、CHF患者において、その重症度に比例して顕著に増加することが示された。血漿BNP-LEIレベルは、通常では $1 \text{ fmol/ml}$ 以下であるが、最も重篤な症例においては $500 \text{ fmol/ml}$ にまで達した(第4図)。このように、hBNPの血漿レベルの%増加率は、重篤な症例では、ANPに比べて1桁以上も大きいものであった(表Ⅱ)。血漿hBNPレベルのこのような上昇は、表Ⅱに示されるように、病的な心臓ではhBNPの分泌が増加することによるものである。以上から、病的な心臓においては、ANPの合成分泌が心房のみならず心室においても増加していることがわかる。従って、CHFに見られるhBNPの血漿レベルの上昇は、ANPよりも格段に高く、心室hBNPによるものであると考えられる。これは、病的な心臓の心室のhBNP mRNAの総量が心房よりもかなり多いという、本発明者らの知見

とよく一致した。

本発明におけるもうひとつの重要な知見は、hBNPが $\alpha$ -hANPよりも長く循環血液中に保持されるということであり、これはBNP/ANP比の増加の順位が、冠状静脈洞<大動脈<大腸静脈である(表Ⅱ)ことから明らかである。またこの事実、循環器系からのhBNPの代謝クリアランスが、 $\alpha$ -hANPよりも低いことを示している。従って、CHF患者では、心臓からのhBNPの分泌の増加に加えて、hBNPのクリアランスの低さが血漿hBNPレベルの上昇をさらに増強することになる。ナトリウム利尿ペプチド受容体は2つのカテゴリー、すなわち、クリアランス受容体と、膜型グアニル酸シクラーゼに結合した生物学的に活性な受容体に分類されるという仮説がある。そこで本発明者らは、ヒトおよび牛の肺から調製されたクリアランス受容体へのhBNPの結合活性と、培養ヒト糸球体間質細胞および牛内皮細胞でのhBNPのcGMP産生能を調べた。hBNPおよび $\alpha$ -hANPのcGMP産

生能は同等であるが、hBNPのクリアランス受容体への結合活性は $\alpha$ -hANPの約7%であった。このことは、循環血液からのhBNPのクリアランスが遅いという興味深い事実と一致する。BNPに比較的特異的な生物学的に活性な受容体の最近の発見を考え合わせると、 $\alpha$ -hANPと異なるhBNPの生物学的臨床の特徴は、hBNPの生理学的病態生理学的意義を解明する手がかりとなり、CHFのような病的状態においては、ANPよりもhBNPが重要な役割を果たしていることを示唆している。

hBNP前駆体の翻訳後の切断は、ヒトANP前駆体とは異なっている。ANPは前駆体 $\alpha$ -ANPとして心臓細胞に蓄積され、分泌の際にPro<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>間がタンパク質分解酵素に切断され、 $\alpha$ -hANPとなる。hBNP前駆体中には、hBNP配列の前に、同じ切断シグナルPro<sup>1</sup>-Arg<sup>1</sup>が存在するが、hBNPが心臓における主な蓄積形態であり、かつ成熟ホルモンとして体内を循環する。このhBNPの切断様式は、rBNPと同

じであるが、ANP様式をとるpBNPとは異なる。ANPやBNPなどのナトリウム利尿ペプチドの異なる切断様式のメカニズムや意義を解明するためには、さらなる研究が必要であろう。

本発明は、BNPが新規なヒトの心臓ホルモンであり、CHF患者においてBNPの循環血液中への分泌および蓄積がANPよりも顕著に増加することを明らかにした。受容体の多様性に関する最近の報告を考慮すると、これらの知見は、巧妙な2つのナトリウム利尿ペプチド系において、BNPがANPとは異なる生理学的病態生理学的役割を果たしていることを示唆している。

以上の検討結果から、本発明のRIAが、心臓病を含む循環器疾患の診断に有用であることは明らかであり、またANPの測定と組み合わせることにより、循環器疾患の詳細な診断が可能になる。

本明細書中で用いられる略号は、以下の通り。  
BNP：脳性ナトリウム利尿ペプチド

hBNP：ヒトBNP

pBNP：豚BNP

rBNP：ラットBNP

ANP：心房性ナトリウム利尿ペプチド

-L1：一様免疫反応性

CHF：慢性心疾患

NYHA：New York Heart Association

#### 実施例

##### モノクローナル抗体の調製

2.3mgのhBNP-28(hBNP[83-108])を、カルボジミドを用いて、牛チログロブリン(0.1mg, Sigma)に結合させた(Rakao, K.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:815-821, 1984)。フロイントの完全アジュバントに乳濁させた20 $\mu$ gのhBNP-28を有する上記結合物を、2~3週間隔で2ヶ月にわたり、BALB/cマウスに皮下投与して、免疫する。2匹のマウスにおいて抗体価が上昇したので、より高い反応性を示した1匹を、細

細胞融合に用いた。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 X83-Ag8.653との融合は、Hukoyama, B.ら, Hypertension 12:117-121, 1988に記載の方法に従った。得られたハイブリドーマは、hBNPのRIAにより抗体産生能に基づき選択し、限界希釈法によりクローン化して、BALB/cマウスの腹腔内で増殖させた。モノクローナル抗体のアイソタイプは、マウスモノクローナルタイピングキット(Miles社製)を用いて、オクタブロー法により決定した。結合親和性は、hBNPのRIAを用いるスクエッチャードプロットにより求めた。

#### 組織と抽出

心臓組織は、心臓の合併症を有しない患者から剖検により得、またCHF患者から剖検または心臓外科手術により得た。サンプルは、液体窒素中で直ちに凍結し、抽出まで $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。組織からのBNPの抽出は、Sugawara, A.ら, J. Clin. Invest. 81:1962-1970, 1988に記載の方

法で行なった。

#### 血漿サンプル

血漿サンプルは、通常の塩摂取量( $168 \pm 15 \text{ mEq/d}$ )の11人の健康者(25-33歳、平均29.6歳)、および39人の心臓病患者(15-78歳、平均54.5歳)から採取した。その患者のうち、12人は冠不全、9人は心臓弁膜症、7人は肥大型心筋症、7人は高血圧性心疾患、2人は先天性心疾患、1人は肥大型閉塞性心筋症、1人は心筋炎であった。New York Heart Association (NYHA) の分類に従えば、8人がクラスI、10人がクラスII、16人がクラスIII、5人がクラスIVに分類される。腎臓疾患はいずれも有していなかった。血液は、一夜絶食後仰臥位で前肘静脈から午前9時に採集し、Na<sub>2</sub>EDTA (1mg/ml) とアプロタニン (1,000KIU/ml) を含む冷却したガラスチューブに直ちに移し、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心した。心臓カテーテルを挿入している6人の患者では、血漿サンプルは、冠状静脈網、大動

脈、大腸静脈を含む種々の部位から採集した。血液は直ちに凍結し、アッセイまで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### hBNPのRIA

[Tyr<sup>3</sup>]-hBNP-26 (1μg) を、クロラミンT法(Nakao, K.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:815-821, 1984)により、放射性ヨウ素で標識した。[<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]-hBNP-26の比活性は、500-900μCi/μgであった。モノクローナル抗体(腹水最終希釈率、 $1:5 \times 10^4$ )は、0.2mlのアッセイバッファー(0.1%ゼラテン、0.1%Triton X-100、1mM Na<sub>2</sub>EDTA、0.2mM L-cystine、および0.1%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含む50mMリン酸バッファー、pH7.4)中で、標準hBNPまたはサンプルのいずれかと共に、24時間 $4^{\circ}\text{C}$ でインキュベートする。次いで、0.05mlの[<sup>125</sup>I][Tyr<sup>3</sup>]-hBNP-26 (10,000cpm) を加え、その混合物をさらに24時間 $4^{\circ}\text{C}$ でインキュベートする。結合リガンドと遊離リガンドは、デキストランコーテッドチャコール法(Nakao, K.

ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:815-821, 1984)により分離した。

血漿BNP様免疫活性(BNP-LI)は、抽出後または抽出無しで測定した。抽出無しのRIAでは、25μlの血漿をインキュベーション混合物に加えた。無ホルモン血漿(Sugawara, A.ら, Hypertension 8[Suppl 1]:I-151-155, 1986)を、標準曲線の構築および血漿サンプルの希釈に用いた。抽出を行なうアッセイでは、5-10mlのサンプルをSep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジ(Waters)で処理した(Saito, Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 158:360-368, 1989)。血漿に添加した3-15fmol/mlのhBNPの平均回収率は、70%だった。抽出後の血漿中のBNP-LIの最小検出量は0.4fmol/mlであり、抽出無しの血漿中のBNP-LIの最小検出量は10fmol/mlだった。

#### ANPのRIA

ANPのRIAは、Nakao, K.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:815-821, 1984に記載

の方法に従った。このRIAは、 $\alpha$ -hANPのC末端部位( $\alpha$ -hANP[17-28])を認識する。hBNPとの交差反応性は、分子レベルで0.01%未満だった。

#### 高速ゲル浸透クロマトグラフィー

##### (HP-GPC)

HP-GPCは、Sugawara, A.ら, J. Clin. Invest. 81:1982-1970, 1988に記載の方法で、TSK-GEL G2000 SWカラム(7.5 × 600 mm, 東洋曹達)を用いて行なった。

#### 逆相高速液体クロマトグラフィー

##### (RP-HPLC)

RP-HPLCは、Nucleosil 5C<sub>18</sub>カラム(4.6 × 150 mm, Nagel)を用いて行ない、0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリル濃度勾配15%~30%により溶出した(Kambayashi, Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 163:233-240, 1989)。

一の交差反応性を示したが、hBNPのC末端断片であるhBNP[103-108]は交差反応性を示さなかった(0.001%未満)。これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体がhBNPのリング構造を認識することを示している。

もう一方の抗体は、KY-hBNP-IIと命名した。これは、IgGサブクラスに属し、hBNPに対して親和定数 $1.8 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ を有する。hBNPのRIAにおけるこのモノクローナル抗体の特異性を第1図Cに示す。hBNP-28は、hBNPと同一の交差反応性を示したが、hBNPのC末端断片であるhBNP[103-108]は交差反応性を示さなかった(0.001%未満)。これらの結果は、本発明のモノクローナル抗体がhBNPのリング構造を認識することを示している。

#### hBNPのRIA

KY-hBNP-Iを用いるhBNPのRIAではその標準曲線(第1図A)から明らかなよう

#### 統計分析

データは、平均±標準偏差(SE)で示した。統計分析は、スチューデント検定、ゲンカマルダブルレンジ検定またはウィルコクソン検定を適宜用いて行なった。直線回帰分析を用いて、結果の相関性を決定した。

#### 結果

##### モノクローナル抗体の調製および特性化

細胞融合の後、288ウェルのうち3つのクローンが抗体反応陽性を示した。これらをさらに培養し、クローン化して、強い反応性を有するクローンを2つ選択した。このようにして確立されたモノクローナル抗体の1つを、KY-hBNP-Iと命名した。このモノクローナル抗体は、IgGサブクラスに属し、hBNPに対して親和定数 $1.0 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ を有する。hBNPのRIAにおけるこのモノクローナル抗体の特異性を第1図Aに示す。hBNP-28は、hBNPと同

に、最小検出量は $0.3 \text{ fmol/tube}$ であり、50%結合阻害濃度は $3 \text{ fmol/tube}$ であった。 $\alpha$ -hANPやrBNPとの交差反応性は0.005%未満であった。pBNP-32は分子レベルで0.1%の交差反応性を示した。測定内および測定間誤差は、それぞれ8.4%( $n=8$ )および6.4%( $n=8$ )であった。

KY-hBNP-IIを用いるhBNPのRIAではその標準曲線(第1図C)から明らかなように、最小検出量は $0.3 \text{ fmol/tube}$ であり、50%結合阻害濃度は $2.5 \text{ fmol/tube}$ であった。 $\alpha$ -hANPやrBNPとの交差反応性は、それぞれ0.14%および0.01%であった。pBNP-32は分子レベルで3.0%の交差反応性を示した。

##### 健康心房中のBNP-LI

ヒト心房および心室抽出物の段階希釈曲線は、第1図Bに示されるように、標準曲線と平行であった。健康心房および心室中のBNP-LIの値



能レベルおよび含有量を、表1に示す。心房中のBNP-LIの平均濃度は $250 \text{ pmol/g}$ であり、かなりの量のBNP-LI( $18 \pm 3 \text{ pmol/g}$ )が心室で検出された。組織重量を考慮すると、心室中のBNP-LI総量( $4.5 \text{ nmol}$ )は、全心臓中の総量( $15.3 \text{ nmol}$ )の約30%に匹敵した。BNP/ANP比は、心房において(2.6%)よりも、心室において(4.9%)かなり高かった。

第2図Aは、健康ヒト心房からの抽出物の典型的なHPLC-GPCプロファイルを示す。BNP-LIは、心房において12Kと3Kダルトンの2つの成分からなるが、3Kのほうの主成分であった。3KのBNP-LIの検出位置は、合成hBNPと一致した。12K成分は、hBNP前駆体と一致した。心室からの抽出は、第2図Aに示されるように、実質的に同一のHPLC-GPCプロファイルを示した。対照的に、健康心臓中のANP-LIは、 $\alpha$ -hANPの前駆体である $\gamma$ -hANPであった(第2図A)。3KのBNP-LI

量は、心房内の量を越える。ANP-LIの組織レベルは、病的な心臓の心房と心室の両方で上昇しており、心室内の全ANP-LI量は、心臓全体の12%であった。

第3図AおよびBは、それぞれ病的ヒト心房および心室からの抽出物の代表的HPLC-GPCプロファイルを示す。病的な心臓の心房抽出物中のBNP-LIは2つの成分からなり、ひとつは主成分のhBNPであり、一方は少量の前駆体であった。これは、正常心房におけるプロファイルと一致した(第2図A)。病的な心室のBNP-LIも実質的に同一のHPLC-GPCプロファイルを示した(第3図B)。ANP-LIに関しては、健康心臓ではほとんど検出できない $\alpha$ -hANPが病的な心房内で増加しており(第3図A)、また心室内では $\gamma$ -hANPがほとんどであった(第3図B)。

#### CHFの血漿BNP-LI

血漿の段階希釈曲線はhBNPの標準曲線と平

Iをさらに解析するために、心房抽出物のRP-HPLCプロファイル进行分析した。第2図Bに示されるように、3KのBNP-LIの保持時間は合成hBNPと一致した。

#### 健康人の血漿BNP-LI

血漿抽出物の段階希釈曲線はhBNPの標準曲線と平行であった(第1図B)。11人の健康人の血漿BNP-LIレベルは $0.90 \pm 0.07 \text{ fmol/ml}$ であり、一方そのANP-LIレベルは $6.4 \pm 0.9 \text{ fmol/ml}$ であった。血漿BNP/ANP比は $1.6 \pm 2\%$ であった。

#### 病的な心臓におけるBNP-LI

病的な心臓におけるBNP-LIレベルは表1に示す。正常心臓のレベルと比較すると、心房におけるBNP-LIレベルは差がないが、心室のレベルは2倍以上高かった。すなわち、心室のBNP-LIレベルは、心房の22%にまで達した。組織重量を考慮すると、心室内の全BNP-LI

行であった(第1図B)。第4図は、健康人と39人の心疾患患者における血漿BNP-LIレベルを示す。CHFを有しない8人の患者(NYHAクラスI)のうち、4人の患者で血漿BNP-LIレベルは $10 \text{ fmol/ml}$ 以下であり、他4人の患者で僅かに上昇した( $14 \sim 22 \text{ fmol/ml}$ )。平均±標準偏差: $14.3 \pm 1.8 \text{ fmol/ml}$ 。NYHAクラスIIの10人の患者のうち、4人ではBNP-LIレベルが $10 \text{ fmol/ml}$ 以下であったが、6人のBNP-LIレベルが上昇し( $12 \sim 399 \text{ fmol/ml}$ )、全体では $68.9 \pm 37.9 \text{ fmol/ml}$ であった。重篤なCHFを有する21人の患者(NYHAクラスIIIまたはIV)では、血漿BNP-LIレベルは顕著に増加した(NYHAクラスIII、 $15 \sim 539 \text{ fmol/ml}$ ;  $155.4 \pm 39.1 \text{ fmol/ml}$ ; クラスIV、 $119 \sim 563 \text{ fmol/ml}$ ;  $267.3 \pm 79.9 \text{ fmol/ml}$ )。このように、血漿BNP-LIレベルの累進的増加は、CHFの重症度に比例していた。

血漿ANP-LIレベルは病気の重症度に従って明らかに増加し(NYHAクラスI、 $24.9 \pm 7.2 \text{ fmol/ml}$ ; クラスII、 $52.4 \pm 19.4 \text{ fmol/ml}$ ; クラスIII、 $109.3 \pm 21.8 \text{ fmol/ml}$ ; クラスIV、 $164.4 \pm 20.3 \text{ fmol/ml}$ )、血漿BNP-LIレベルと相関性が高かった( $r=0.747$ ,  $p<0.01$ )。しかし、血漿中のBNP-LI/ANP-LI比は、CHFの重症度に応じて、著しく変化した。健康人では血漿BNP-LIレベルがANP-LIレベルの16%であるのに対して、重篤なCHF(NYHAクラスIIIおよびIV)を有する患者の平均血漿BNP-LIレベルはANP-LIレベルよりもずっと高かった。血漿内のBNP-LIとANP-LIの関連をさらに分析するために、対象をその血漿ANP-LIレベルに従って4つのグループに分類した(表II)。通常の血漿ANP-LIレベルを有するグループAでは、血漿BNP-LIレベルはかなり低かった。グループBでは、BNP-LIレベルはANP-LI

のレベル付近まで上昇した。グループCでは、BNP-LIレベルはANP-LIレベルとほとんど同じであった。ほとんどの患者がNYHAクラスIIIおよびIVに分類されるグループDでは、BNP-LIレベルの上昇はさらに増大し、ANP-LIレベルを越えた。グループAのレベルと比較すると、グループDのBNP-LIの増加は200~300倍であり、20~30倍の増加であるANP-LIとくらべて遙かに高い値を示した。

第3図CはCHF患者の血漿抽出物の典型的なHP-GPCプロファイルを示す。血漿BNP-LIは主にhBNPからなるが、その前駆体が微量成分として存在した。

#### 心臓カテーテル中の血漿BNP-LI

表IIは、心臓カテーテルを施された6人の患者の種々の部位から採集された血漿中のBNP-LIおよびANP-LIレベルを示す。冠状静脈洞の血漿BNP-LIレベルと、冠状動脈口付近の上行大動脈のレベルとを比較すると、全ケースに

おいて冠状静脈洞の血漿BNP-LIレベルが2~3倍高かった。これは、BNP-LIは、心臓から冠状静脈洞を通して循環血液へ分泌されることを示している。

冠状静脈洞のBNP-LIレベルはCHFの重症度に比例して増加した。さらに、冠状静脈洞と大動脈間のBNP-LIの差、すなわちその分泌率の指標となる $\Delta(\text{CS-Ao})\text{BNP}$ においても、同様の増加が見られ、これはBNP-LIの分泌が重篤なCHFにおいて増加していることを示している。冠状静脈洞のANP-LIレベルと $\Delta(\text{CS-Ao})\text{ANP}$ は、重篤な症例において上昇する傾向が見られたが、その上昇はBNP-LIレベルと比べてかなり小さなものであった。従って、 $\Delta(\text{CS-Ao})$ に関するBNP/ANP比は重篤な症例において増大し、BNPの分泌が重篤なCHFにおいてANPの分泌と比べてより顯著に増加することを示している。

血漿BNP/ANP比は、いずれの症例においても、冠状静脈洞よりも大動脈のほうが大きい。

この比率は、大動脈でさらに増加する。このBNP/ANP比の上昇は、 $\Delta(\text{CS-Ao})$ に関する比率の上昇と比較しても注目される。これらの結果は、BNPは、分泌後循環血液中において、ANPよりも長く保持されることを示している。

#### 発明の効果

BNPは、豚およびラットにおいて、心臓で合成され分泌されることが、既に報告されていたが、ヒトにおけるBNPについてはほとんど何も知られていなかった。本発明は、hBNPに対するモノクローナル抗体KY-hBNP-IおよびKY-hBNP-IIとhBNPの特異的で高感度なRIAを提供する。KY-hBNP-IおよびKY-hBNP-IIは、hBNPの、ナトリウム利尿ペプチドの生物学的作用に必須なリング構造を認識するので、本発明のRIAはhBNPのみならずN末端やC末端が修飾(付加や削除)された形態のhBNP、例えば、前駆体をも検出することができ、hBNPの生合成、細胞内修飾お

よび代謝を研究する上で有用である。

(以下余白)

表 I  
健康および病的ヒト心臓におけるBNPとANPの組織レベルおよび全量

	健康心臓				病的心臓			
	BNP	ANP	BNP/ANP	BNP/ANP	BNP	ANP	BNP/ANP	BNP/ANP
組織レベル	pmol/g	pmol/g	pmol/g	pmol/g	pmol/g	pmol/g	pmol/g	pmol/g
	250±80	9800±3100	2.6	2.6	180±60	12300±3700	1.5	1.5
	18±3	37±14	49	49	40±11	330±94*	12	12
V/AX	7.2	0.4	-	-	22	2.7	-	-
全量	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol
	10.8±2.7	420±140	2.6	2.6	14.7±4.7	1000±310	1.5	1.5
	4.5±0.8	9.1±3.5	49	49	15.9±4.2*	135±31**	12	12
V/AX	42	2.2	-	-	108	14	-	-
A/A+VX	70	98	-	-	48	88	-	-
V/A+VX	30	2	-	-	52	12	-	-

数値は、6例の健康心臓組織および8例の病的組織の平均±標準偏差で示す  
V:心室 A:心房  
\*P<0.05と\*\*P<0.01は、健康心臓との比較

表 II

血漿ANPレベルで分類した4群の血漿BNPレベルとBNP/ANP比

群	n	ANP (fmol/ml)	BNP (fmol/ml)	BNP/ANP
A (<20)	11	6.4±0.9	0.90±0.07	0.16±0.02
B (20-40)	7	28.3±2.1	26.3±6.4*	0.91±0.20*
C (40-80)	9	64.8±4.0	66.2±13.7**	1.02±0.21*
D (≥80)	14	168.1±20.2	274.9±47.1***	1.79±0.39**

数値は、平均±標準偏差で示す

\*P<0.01と\*P<0.001はA群との比較

\*\*P<0.05と\*P<0.01はB群との比較

\*\*\*P<0.01はC群との比較

表 Ⅱ

心臓カテーテル時に種々の部位から採取した血漿BNPおよびANPレベル

症 例	年齢 / 性	病名	NYHA 分類	冠状静脈洞			大動脈			大静脈			△(CS-Ao)		
				BNP	ANP	BNP/ANP	BNP	ANP	BNP/ANP	BNP	ANP	BNP/ANP	BNP	ANP	BNP/ANP
1	62/M	OHI	I	22	266	0.08	<5	27	<0.18	<5	19	<0.26	<22	189	<0.12
2	29/M	HS+IR	II	38	255	0.15	17	98	0.18	11	41	0.27	21	159	0.13
3	74/M	OHI	II	88	358	0.25	34	92	0.37	12	28	0.43	54	266	0.20
4	45/M	DCH	II	202	829	0.24	81	105	0.77	78	76	1.03	121	824	0.23
5	32/F	ASR	II	813	837	1.28	419	287	1.46	399	219	1.82	394	350	1.13
6	61/F	ROCH+DR	III	303	328	0.92	175	154	1.14	118	65	1.73	128	174	0.74

血漿BNPおよびANPレベルはfmoI/mlで示す。NYHA: New York Heart Association, △(CS-Ao): 冠状静脈洞と大動脈間のレベルの差。OHI: 陈旧性心筋梗塞。HS: 僧帽弁狭窄症。IR: 三尖弁狭窄症。DCH: 拡張型心筋症。ASR: 大動脈弁狭窄症。ROCH: 肥大型閉塞性心筋症。DR: 僧帽弁狭窄症。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図AおよびBは、それぞれ、モノクローナル抗体KY-hBNP-IによるhBNPのRIAにおける、hBNPの標準曲線と関連ペプチドとの交差反応性および試料の希釈曲線を示す。第1図Cは、モノクローナル抗体KY-hBNP-IIによるhBNPのRIAにおける、hBNPの標準曲線と関連ペプチドとの交差反応性を示す。

第2図は、健康心房抽出物のHP-GPCプロファイル(A)およびRP-HPLCプロファイル(B)を示す。(A)における矢印は、ポリペプチド分子量校正キット(Pharmacia)の一連のヒオグロビンの抽出位置と、ボイド体積(V<sub>0</sub>)および全体積(V<sub>t</sub>)を示す。さらに、天然hANP、合成hBNPおよびα-hANPの抽出位置も示す。(B)における矢印は、合成hBNPとα-hANPの保持時間を示す。

第3図は、病的心臓の心房(A)および心室(B)の抽出物、およびCHF患者から採取した血漿のHP-GPCプロファイルを示す。矢印は第

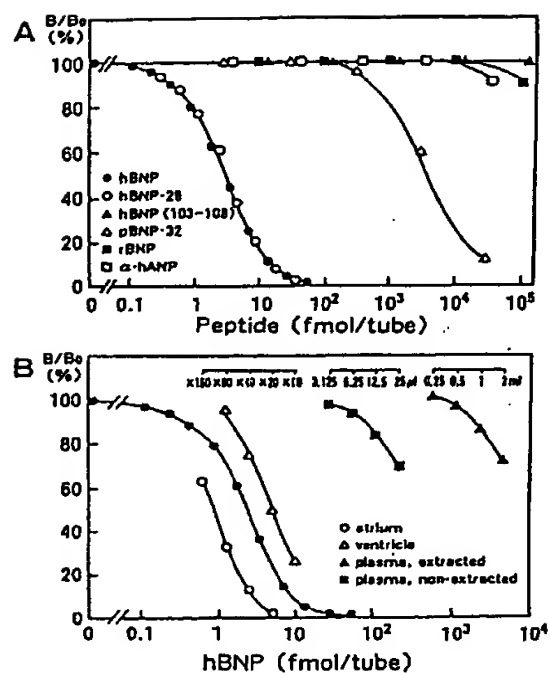
2図Aと同義である。

第4図は、11人の健康人と39人の心疾患患者の血漿BNP-LIレベルを示す。患者は、NYHAの機能的分類に従い分類し、それぞれの群のBNP-LIレベルの平均±標準偏差で示した。\*P<0.05と\*\*P<0.01は健康人との比較。\*P<0.05と:P<0.01はNYHAクラスI群との比較。BP<0.05はNYHAクラスI群との比較。

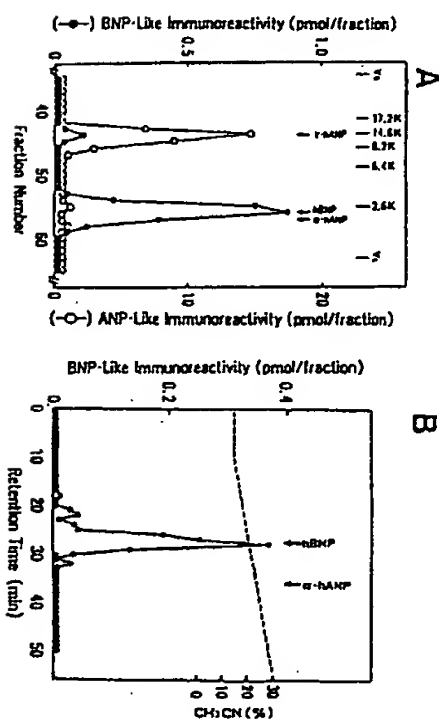
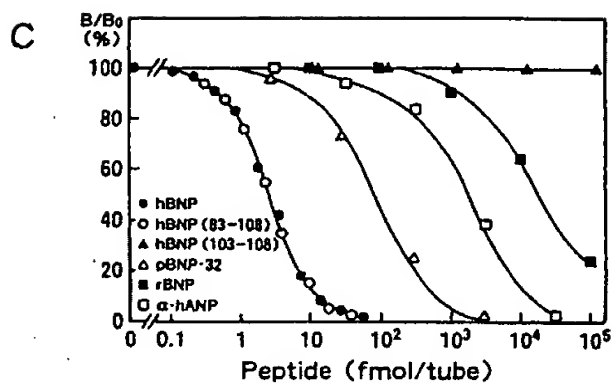
出願人: 塩野義製薬株式会社

代理人: 弁理士 岩崎 光隆

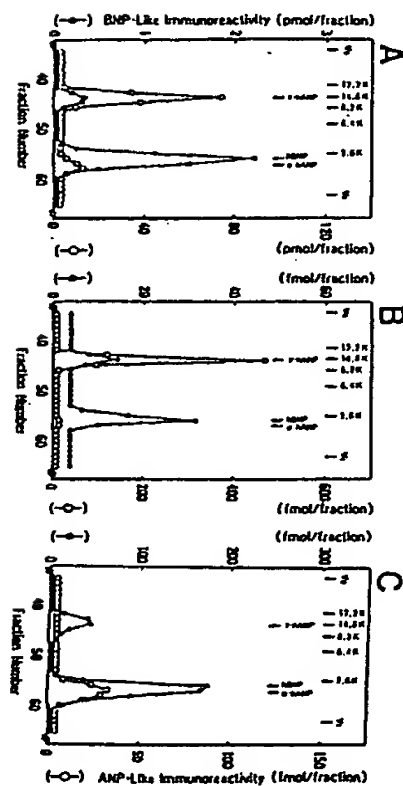
第 1 図



第 1 図 (つづき)



第 2 図



第 3 図

第 4 図

